

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000694

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES
Number: P200400121
Filing date: 21 January 2004 (21.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 03 June 2005 (03.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCION número 200400121 , que tiene fecha de presentación en este Organismo el 21 de Enero de 2004.

Madrid, 10 de Febrero de 2005

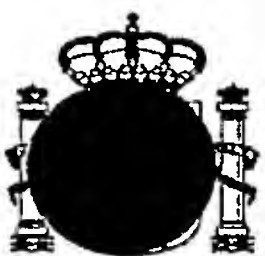
El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica

P.D.

ANA Mª REDONDO MÍNGUEZ



1



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200400121

4 ENE 21 11:20

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

MADRID

CÓDIGO

28

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

CONSEJO SUP. INVESTIG. CIENTÍFICAS

BIONOSTRA, S.L.

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS

ES

ES

DNI/CIF

Q2818002D

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO 91 5855000

FAX 91 5855287

CORREO ELECTRÓNICO ott@csic.es

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

RODRÍGUEZ AGUIRRE

RUIZ CASTÓN

GONZÁLEZ DE LLANO

NOMBRE

JOSE FCO

JOSÉ

Mª DOLORES

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

CÓDIGO

PAÍS

ES

ES

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO

PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENÉSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS:

☒ Nº DE REIVINDICACIONES:

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS:

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☒ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: AUTORIZACIÓN

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

Domingo Repun

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD. 310/i - 1 - EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400121

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

Las cápsidas vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), se caracterizan porque están constituidas, únicamente, por ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV. Dichas cápsidas tienen actividad inmunogénica y pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas para proteger animales de la infección causada por IBDV así como en la elaboración de vectores para terapia génica.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

P200400121

FECHA DE PRESENTACIÓN

☐ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:		APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME
(7) INVENTORES:		APELLIDOS	NOMBRE		NACIONALIDAD			
OÑA BLANCO			ANA Mª		ESPAÑOLA			
ABAITUA ELUSTONDO			FERNANDO		ESPAÑOLA			
LUQUE BUZO			DANIEL		ESPAÑOLA			
RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA			JUAN RAMÓN		ESPAÑOLA			
(12) EXPOSICIONES OFICIALES:			LUGAR		FECHA			
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:			CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA			
PAÍS DE ORIGEN								



200400121

12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21

NÚMERO DE SOLICITUD

31

NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32

FECHA

33

PAÍS

22

FECHA DE PRESENTACIÓN

62

PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

71

SOLICITANTE (S)

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
BIONOSTRA, S.L.**

DOMICILIO **SERRANO, 117 - 28006 MADRID**

NACIONALIDAD **ESPAÑOLA**

72

INVENTOR (ES) **José Francisco Rodríguez Aguirre, José Ruiz Castón, M^a Dolores González de Llano, Ana M^a Oña Blanco, Fernando Abaitua Elustondo, Daniel Luque Buzo y Juan Ramón Rodríguez Fernández-Alba**

51

Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54

TÍTULO DE LA INVENCION

**CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA
ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES**

57

RESUMEN

**CCÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV),
SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES**

Las cápsidas vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), se caracterizan porque están constituidas, únicamente, por ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV. Dichas cápsidas tienen actividad inmunogénica y pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas para proteger animales de la infección causada por IBDV así como en la elaboración de vectores para terapia génica

CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES

5 CAMPO DE LA INVENCION

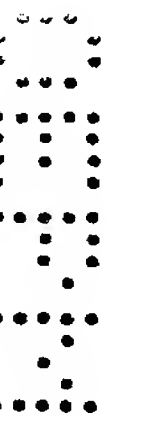
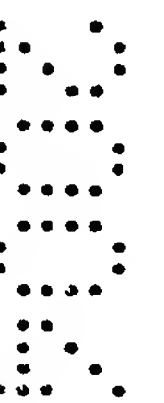
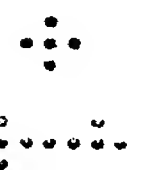
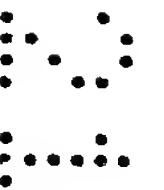
La invención se refiere a cápsidas virales vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), con actividad inmunogénica frente a IBDV, constituidas por las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, a su producción mediante ingeniería genética y a sus aplicaciones, en particular, en la elaboración de vacunas frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa causada por IBDV y en la elaboración de vectores para terapia génica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), también conocida como enfermedad de Gumboro, pertenece a la familia Birnaviridae, infecta distintas especies aviares y es el responsable directo de una grave enfermedad inmunosupresora causante de importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial.

Las partículas de IBDV son icosaédricas, con una simetría T=13, carecen de envuelta y están formadas por una única capa proteica. Hasta el momento, las aproximaciones encaminadas a la obtención un modelo atómico para las partículas de IBDV han fracasado. Por ello, la información estructural disponible está basada en modelos tridimensionales generados a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y de VLPs. En base a esos estudios, se ha comprobado que la superficie externa de la partícula está formada por un entramado continuo de 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) ordenados en cinco conformaciones diferentes. La cara interna de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), estos últimos, independientes entre sí, se encuentran unidos a la zona basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28 kDa), también podría formar parte de las partículas, estando situado en la base de los pentámeros que forman los vértices de la estructura icosaédrica.

Los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de un tamaño de 109 kDa. Este precursor se



procesa auto-catalíticamente liberando los polipéptidos pVP2 (48 kDa), VP3 y VP4. El dominio VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las proteasas Lon y es el responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son los responsables directos del ensamblaje de las cápsidas. El producto

5 pVP2 sufre un último corte en su extremo C-terminal antes de dar lugar a la forma madura de la proteína, VP2, que es la que se encuentra en las partículas purificadas (Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of Virology* 76:2393-

10 2402). Este procesamiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsidas y requiere de la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical

15 role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49).

Las vacunas convecionales empleadas para el control de la bursitis infecciosa se basan en el empleo de cepas, con diferentes grados de virulencia, del propio IBDV crecidas en cultivo celular o en huevos embrionados. Los extractos que contienen el material infeccioso son sometidos a procesos de inactivación química para producir

20 vacunas inactivadas o bien son empleados de forma directa para producir vacunas vivas atenuadas (Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S. & Yeh, H. Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology* 24:223-235; van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G. 2000. *Rev Sci Tech* 2000, 19:509-543). Este último tipo de vacunas

25 presenta los inconvenientes clásicos asociados con el empleo de vacunas vivas atenuadas, concretamente, el riesgo de mutaciones que reviertan la virulencia del virus o le hagan perder su inmunogenicidad.

Se han descrito vacunas sub-unidad recombinantes que contienen la proteína VP2 de IBDV expresada en diversos sistemas de expresión, por ejemplo, bacterias,

30 levaduras o baculovirus, normalmente en forma de proteína de fusión. Los resultados obtenidos en ensayos de inmunización de pollos con dichas vacunas no han sido completamente satisfactorios.

Las cápsidas virales vacías o partículas pseudovirales (VLPs, del inglés “virus-like particles”), constituyen una alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas y de vacunas sub-unidad recombinantes. Las VLPs se obtienen por autoensamblaje de las sub-unidades constituyentes de la cápsida viral y mimetizan la estructura y propiedades antigénicas del virión nativo aunque carecen de material genético por lo que son incapaces de replicarse. Además de su aplicación con fines vacunales las VLPs pueden ser utilizadas como vectores de moléculas de interés biológico, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos o proteínas. A modo ilustrativo pueden citarse VLPs de parvovirus (US 6.458.362) o del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (US 6.602.705).

La morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

En trabajos previos se ha demostrado este principio para el ensamblaje de las cápsidas de IBDV (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). La expresión en células eucarióticas del gen codificador para la poliproteína de IBDV da lugar a la formación de VLPs totalmente indistinguibles morfológica y bioquímicamente de los viriones de IBDV. Asimismo, se ha comprobado que el ensamblaje de las cápsidas necesita únicamente de la síntesis y del correcto procesamiento de la poliproteína viral y es independiente de la presencia del genoma vírico o de otras proteínas codificadas por el genoma viral tales como VP5 y VP1.

Paralelamente a la formación de cápsidas, el producto VP4 de IBDV es capaz de autoensamblarse en estructuras tubulares de 20 nm de diámetro. Estos túbulos, conocidos como túbulos de tipo II, se co-purifican parcialmente con las partículas virales. Otros experimentos han demostrado que la obtención de VLPs de IBDV, utilizando para la expresión de la poliproteína baculovirus recombinantes (rBVs), es extremadamente ineficiente obteniéndose como resultado la acumulación de grandes

cantidades de túbulos de tipo I en el citosol de las células infectadas (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278:322-331; Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. & Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *Journal of Virology* 76:2384-2392). Recientemente se ha demostrado que esto es debido al corte proteolítico a que es sometida la proteína VP3 cuando es sintetizada en células de insecto. Dicha proteólisis se previene casi totalmente por la formación de complejos VP3/VP1 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-6449).

Por tanto, los resultados obtenidos hasta la fecha a partir de la expresión de los genes de IBDV en distintos sistemas recombinantes ha permitido concluir que: (i) el proceso de ensamblaje es independiente de la presencia del material genético del virus, (ii) para el ensamblaje sólo son necesarios los polipéptidos codificados por el gen de la poliproteína, y (iii) el ensamblaje requiere de una interacción coordinada entre los péptidos pVP2 y VP3.

Sin embargo, no se conoce si la interacción pVP2/VP3 se establece entre dominios de VP2 y VP3 de la poliproteína precursora cuando aún no ha sufrido modificaciones, o si por el contrario, esta interacción ocurre tras el procesamiento del precursor. Además, la información actual no excluye la posibilidad de que VP4 pudiera jugar un papel relevante en la morfogénesis de la cápsida viral. De hecho, se han descrito VLPs de IBDV formadas por ensamblaje de las proteínas VP2, VP3 y VP4 de IBDV (US 6.528.063, US 5.788.970 y JP 5194597).

Por otro lado, la información acerca de la expresión de proteínas de IBDV mediante ingeniería genética en distintos modelos celulares es escasa. Se ha descrito la expresión de proteínas de IBDV en células de insecto, bacterias y levaduras. Jagadish et al. (Jagadish MN, Vaughan PR, Irving RA, Azad AA, Macreadie IG. (1990). Expression and characterization of infectious bursal disease virus polyprotein in yeast. *Gene* 9:179-186; Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, McKern NM, Jagadish MN, Heine HG, Ward CW, Fahey KJ, Azad AA. (1990). Passive protection against

infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. Vaccine 8:549-552) describen la expresión de VP2 de IBDV en levaduras. Los resultados descritos indican que la expresión de la poliproteína viral en 2 especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*, es muy ineficiente, acumulándose una gran
 5 variedad de productos proteicos de diferente masa molecular. El fracaso en la obtención de productos proteicos del tamaño esperado y la imposibilidad de detectar estructuras producidas por el ensamblaje de éstas fue atribuido a dos posibles causas: (i) una posible toxicidad de la proteasa de IBDV (VP4) en este sistema; y/o (ii) la ineficiencia del sistema de expresión para llevar a cabo una transcripción y/o traducción correcta de
 10 la poliproteína de IBDV. Recientemente, Pitcovski et al. (Pitcovski J., Gutter B, Gallili G, Goldway M, Perelman B, Gross G, Krispel S, Barbakov M, Michael A. (2003). Vaccine 21:4736-4743) han descrito la expresión de VP2 de IBDV en *Pichia pastoris* y la inmunización de pollos con un material que comprende la proteína recombinante (rVP2) en forma parcialmente purificada. En ningún caso se ha descrito la obtención en
 15 levaduras de VLPs de IBDV.

Un trabajo previo desarrollado por los inventores ha permitido establecer sistemas para la obtención de VLPs de IBDV empleando diferentes vectores de expresión eucariótica. Estos vectores han sido utilizados para la expresión de la poliproteína de IBDV en ausencia o presencia de la RNA polimerasa viral VP1. La
 20 caracterización bioquímica de las VLPs purificadas demuestra que contienen las proteínas pVP2, VP2 y VP3, cuando se expresa únicamente la poliproteína viral y las proteínas pVP2, VP2, VP3 y VP1 cuando se realiza la expresión simultánea de la poliproteína y la RNA polimerasa viral (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal
 25 disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054; Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278: 322-331; Maraver, A., et al., (2003) citado
 30 *supra*; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal*

of Virology 73: 6973-6983). Sin embargo, no se han descrito previamente VLPs basadas únicamente en pVP2 y VP3 de IBDV, ni su potencial uso con fines vacunales o como vehiculizadoras de productos biológicos de interés.

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas vacunas eficaces y seguras frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

La solución proporcionada por esta invención se basa en que es posible obtener VLPs de IBDV correctamente ensambladas mediante la expresión simultánea de los polipéptidos pVP2 y VP3 de IBDV como genes independientes y como única representación de las proteínas de IBDV en un sistema de expresión génica. Dichas VLPs están formadas por autoensamblaje de, únicamente, pVP2 y VP3 de IBDV, por lo que carecen de VP4 de IBDV, y, por ese motivo, se denominan VLP(-VP4) (singular) o VLPs(-VP4) (plural) en esta descripción. Dichas VLPs(-VP4) pueden ser utilizadas, por ejemplo, con fines terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, en la elaboración de vacunas para proteger aves de la infección causada por IBDV o en la elaboración de vectores para terapia génica.

Los resultados obtenidos permiten concebir dos nuevas conclusiones al entendimiento del patrón de ensamblaje del IBDV: (i) las interacciones entre los polipéptidos pVP2/VP3 dan como resultado un ensamblaje eficiente de las partículas de IBDV sin necesidad de la expresión de la poliproteína completa, y (ii) el polipéptido VP4 no es necesario para la formación de la cápsida.

Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia o procedimiento para la producción eficiente de VLPs de IBDV que contienen los elementos proteicos antigénicamente relevantes para inducir una respuesta inmune. Esta estrategia se basa en la utilización de un sistema o vector de expresión génica que permite la coexpresión de los polipéptidos pVP2 y VP3 como genes independientes y que evita la síntesis de la poliproteína precursora de dichos polipéptidos así como la presencia del polipéptido VP4 durante el proceso de ensamblaje de las cápsidas virales vacías.

En una realización particular, se describe la expresión y obtención de VLPs de IBDV, en particular, VLPs(-VP4), en células de insecto mientras que en otra realización particular dichas VLPs(-VP4) se obtienen en levaduras, con un rendimiento muy elevado y con un coste económico muy bajo.

Las vacunas obtenidas utilizando dichas VLPs(-VP4) presentan numerosas ventajas ya que, por una parte, se evita la manipulación de material altamente infeccioso, se previene el riesgo potencial de aparición de nuevos mutantes de IBDV y se elimina el uso de virus vivo en las explotaciones avícolas, previniéndose de este modo el riesgo de diseminación de cepas vacunales de IBDV al Medio Ambiente, y, por otra parte, permite el desarrollo de sistemas de diagnóstico diferencial para discriminar entre animales vacunados e infectados. Estos sistemas de diagnóstico se basan en la detección de anticuerpos frente a las proteínas VP2 y VP4. Los animales con IBDV desarrollan una fuerte respuesta humoral frente a ambas proteínas. Mientras que los animales inmunizados con VLPs(-VP4) solo presentan anticuerpos frente a la proteína VP2.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituye una cápsida viral vacía de IBDV, VLP(-VP4), con actividad inmunogénica frente a la infección en IBDV, caracterizada porque está constituida por autoensamblaje de, únicamente, las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV.

Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV proporcionadas por esta invención, basado en la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV como dos genes independientes.

Los ácidos nucleicos, construcciones génicas, sistemas de expresión y células huésped desarrollados para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Dichas VLPs(-VP4) de IBDV tienen la capacidad de inmunizar animales, en particular, aves, frente a la enfermedad aviar causada por el IBDV así como la capacidad de vectorizar o vehiculizar moléculas de interés biológico, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En una realización particular, dichas VLPs(-VP4) de IBDV pueden ser utilizadas en la elaboración de una vacuna para proteger aves frente al virus causante de la enfermedad aviar conocida como bursitis infecciosa (IBDV). Prácticamente cualquier ave, preferentemente aquellas especies aviares de interés económico, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices, avestruces, etc., pueden ser inmunizadas frente a la infección causada por IBDV con las vacunas proporcionadas por esta invención. En otra realización particular,

dichas VLPs(-VP4) de IBDV pueden vehiculizar, en su interior, productos con actividad biológica, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de vectores para terapia génica.

Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el empleo de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, en la elaboración de medicamentos, tales como vacunas y vectores para terapia génica. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención. En una realización particular, dicha vacuna es una vacuna útil para proteger aves de la infección causada por IBDV. En una realización concreta, dichas aves seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces, preferentemente, pollos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. (a) El diagrama esquematiza los pasos de procesamiento proteolítico necesarios para la formación de las proteínas maduras de la cápsida VP2 y VP3 a partir de la poliproteína precursora. (b) El diagrama refleja las diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV descritas hasta el momento, así como las estructuras producidas mediante su expresión en diferentes sistemas heterólogos. Los números indican la posición correspondiente al primer y último residuo aminoacídico de la poliproteína presente en cada una de las construcciones. La parte inferior de la figura muestra imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las estructuras obtenidas mediante expresión de las diferentes construcciones. La barra corresponde a 50 nm. Los datos han sido tomados de las siguientes referencias: Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*; Maraver *et al.*, (2003), citado *supra*; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, (2000), citado *supra*; Castón *et al.*, 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *Journal of Virology* 75, 10815-10828.

Figura 2. Análisis microscópico de células de insecto H5 que coexpresan pVP2 y VP3. La distribución subcelular de las proteínas pVP2 y VP3 fue analizada mediante inmunomicroscopía confocal. Células infectadas con los rBVs FB/pVP2 (a), FB/VP3 (b), o FBD/pVP2-VP3 (c-e) fueron incubadas con suero de conejo anti-pVP2 y suero de rata anti-VP3. A continuación, las células fueron incubadas con suero de cabra anti-Ig de conejo acoplada a Alexa 488 (rojo) y con suero de cabra anti-Ig de rata

acoplada a Alexa 594 (verde). Los núcleos se tiñeron con To-Pro 3 (azul). (e) Superposición de las imágenes mostradas en los paneles (c) y (d). Imágenes de microscopía electrónica correspondientes a secciones de células H5 infectadas con diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV. (f) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con virus FB parental. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (g) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVP2-VP3. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (h) Imagen de alta magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVP2-VP3 que muestra en detalle la formación de estructuras de IBDV. (i) Imagen de alta magnificación de una célula BSC1 infectada con el virus vacunal recombinante VTLacOI/POLY mostrando estructuras similares a las detectadas en el panel (h). Las barras indican 600 nm (paneles f y g) y 200 nm (paneles h e i).

Figura 3. Caracterización estructural y bioquímica de las estructuras derivadas de IBDV producidas en células de insecto co-infectadas con los baculovirus recombinantes (rBV) FB/pVP2 + FB/his-VP3. Células co-infectadas con los rBV FB/pVP2 y FB/his-VP3, o infectadas con el virus FBD/Poly-VP1 o FB/pVP2 fueron empleadas para purificar estructuras derivadas de IBDV mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. Los paneles (a), (b), y (c) muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la fracción 4 de los gradientes obtenidos a partir de las infecciones con FBD/Poly-VP1, FB/pVP2+FB/his-VP3, y FB/pVP2, respectivamente. El panel (d) muestra los resultados de un análisis mediante Western blot de los gradientes de sacarosa correspondientes a cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 y FB/pVP2+FB/his-VP3, respectivamente. Los extractos totales (input) y las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa (la fracción F1 corresponde al fondo del gradiente) fueron analizadas mediante Western blot empleando sueros específicos frente a las proteínas VP1, pVP2, VP3, y VP4 de IBDV, respectivamente. Se indica la masa molecular en kDa de los polipéptidos inmunoreactivos.

Figura 4. Caracterización bioquímica y estructural de VLPs de IBDV producidas en *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP. Un cultivo de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP fue crecido a 30°C en medio suplementado con el inductor galactosa. A las 18 h el cultivo fue recogido y centrifugado. El sedimento resultante fue procesado mediante

fraccionamiento en un gradiente lineal 25-50% de sacarosa. A) Análisis bioquímico de muestras correspondientes al sedimento antes de fraccionar (T) así como de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y western blot empleando anticuerpos específicos frente a las proteínas VP3 (anti-VP3) y pVP2 (anti-pVP2). Las flechas indican las posiciones de las bandas inmunoreactivas correspondientes a las proteínas VP3-GFP (61 kDa) y pVP2 (48 kDa), respectivamente. B) El análisis estructural de las muestras obtenidas fue realizado mediante TEM. La imagen corresponde a una micrografía obtenida a partir de una alícuota correspondiente a la mezcla de las fracciones 7, 8 y 9 del gradiente de sacarosa. La muestra fue teñida con acetato de uranilo y observada mediante TEM. La barra corresponde a 65 nm. C) Muestra de VLPs obtenidas mediante la expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante infección con el virus vacunal recombinante VT7/Poly (Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*). La barra corresponde a 65 nm.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención proporciona una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), en adelante VLP(-VP4) de la invención, caracterizada porque está constituida por ensamblaje de, únicamente, proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV.

El término “IBDV”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19: 509-43] y los términos “proteína pVP2 de IBDV” y “proteína VP3 de IBDV” se refieren a las diferentes formas de las proteínas pVP2 y VP3 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos

un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

La proteína pVP2 de IBDV presente en la VLP(-VP4) de la invención puede ser cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la
5 proteína pVP2, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136]

La proteína de VP3 de IBDV presente en la VLP(-VP4) de la invención puede ser cualquier proteína VP3 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la
10 proteína VP3, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136].

En una realización particular, las VLPs(-VP4) de la invención presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros sistemas de expresión (Figura 4C).

Las VLPs(-VP4) de la invención pueden obtenerse mediante la expresión
15 simultánea de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, en células huésped apropiadas. Dichas células huésped apropiadas son células que contienen la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas. En una realización particular, dichas células huésped
20 apropiadas son células transformadas, transfectadas o infectadas con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que
25 comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha
30 proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, en forma de 2 genes independientes. De forma más concreta, el ácido nucleico proporcionado por esta invención se caracteriza porque su secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase

de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV. Una característica del ácido nucleico proporcionado por esta invención es que carece de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP4 de IBDV. Tal como se utiliza en esta descripción, el término “fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2” o “fase de lectura abierta correspondiente a la proteínas VP3 de IBDV” incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases de lectura abierta, otras fases de lectura abiertas análogas a las mismas codificantes de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV. El término “análogo/a”, tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de pVP2 y VP3 de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción génica que comprende un ácido nucleico proporcionado por esta invención, es decir, un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV. Dicha construcción génica carece de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP4 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión seleccionado entre:

- 5 a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV; y
- 10 b) un sistema de expresión que comprende dos construcciones génicas, una primera construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y una segunda construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, operativamente unida a unos
- 15 elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En una realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

25 En otra realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende (i) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y

30 (ii) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en el sistema de expresión proporcionado por esta invención incluyen promotores, que dirigen la transcripción de las secuencias de nucleótidos de interés a las que están operativamente enlazados, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc.

Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación del sistema de expresión proporcionado por esta invención. A modo ilustrativo, dichos sistemas o vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un plásmido, tal como un plásmido adecuado para transformar levaduras, por ejemplo, el plásmido denominado pESCURA/pVP2-VP3-GFP (Ejemplo 2), o un virus, tal como un baculovirus recombinante (rBV), por ejemplo, el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2), que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas (pVP2 de IBDV e his-VP3) simultáneamente en células de insecto, o los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1) que expresan las proteínas pVP2 de IBDV e his-VP3, respectivamente, cuando co-infectan células de insecto, obteniéndose VLPs(-VP4) de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped que contiene la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción

génica o bien en dos construcciones génicas diferentes. En una realización particular, dicha célula huésped es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con (i) un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende bien una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con (ii) un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y otra construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV.

En una realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y con una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Prácticamente cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por un sistema de expresión proporcionado por esta invención puede ser utilizada, por ejemplo, células de mamífero, células aviares, células de insecto, levaduras, etc.; no obstante, en una realización particular, dicha célula huésped se selecciona entre levaduras y células de insecto. Las levaduras son adecuadas por razones

de simplicidad y coste de producción. Las células de insecto son adecuadas cuando el sistema de expresión comprende uno o dos baculovirus recombinantes (rBV). El empleo de rBV es ventajoso por cuestiones de bioseguridad relacionadas con el rango de huésped de los baculovirus, incapaces de replicar en otros tipos celulares que no sean de insecto.

5 En una realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc., transformada con un sistema de expresión, tal como un plásmido o un vector de expresión, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia
10 de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, infectada con un sistema de expresión, tal como un baculovirus recombinante, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha
15 proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, co-infectada con un sistema de expresión que comprende un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada
20 por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y con un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de
25 VLPs(-VP4) de la invención que comprende cultivar una célula huésped proporcionada por esta invención que contiene la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes, y que expresa simultáneamente dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, si se desea,
30 recuperar dichas VLPs(-VP4) de la invención. En una realización particular, dicha célula huésped proporcionada por esta invención es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la

secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV.

Dicho procedimiento comprende, por tanto, la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV como dos genes independientes. Tras la expresión simultánea de dichas proteínas (pVP2 y VP3 de IBDV) en dichas células, las proteínas expresadas se ensamblan y forman las VLPs(-VP4) de la invención, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y purificación de dichas VLPs(-VP4) de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

En una realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se realiza mediante el empleo de un rBV que permite la expresión simultánea de dichas proteínas a partir de dos genes quiméricos independientes en células de insecto. En este caso, la producción de VLPs(-VP4) de la invención puede realizarse mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un rBV que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, tal como el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2) o bien, alternativamente, la obtención de un rBV que contiene una construcción genica que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la obtención de otro rBV que contiene una construcción génica que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, tales como los rBVs denominados FB/pPV2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1), seguido de la infección de células de insecto con dicho sistema de expresión basado en dicho(s) baculovirus recombinante(s), expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs(-VP4) de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs(-VP4) de la invención.

La construcción de un baculovirus recombinante que permite la expresión de forma independiente de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel

host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. Gene 160: 191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol 67: 4566-79).

En otra realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se realiza mediante el empleo de un vector que permite la expresión de dichas proteínas en células de levadura. En este caso, la producción de VLPs(-VP4) de la invención puede llevarse a cabo mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un plásmido que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, seguido de la transformación de levaduras con dicho sistema de expresión, expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs(-VP4) de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs(-VP4) de la invención. En una realización concreta, el sistema de expresión adecuado para transformar levaduras está basado en un sistema de expresión pESC Yeast (Stratagene) tal como, por ejemplo, el plásmido pESCURA/pVP2/VP3-GFP (Ejemplo 2) que contiene una construcción génica que codifica para las proteínas pVP2 de IBDV y VP3-GFP.

La obtención de levaduras transformadas con una construcción génica o con un sistema o vector de expresión apropiado que permite la expresión simultánea de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual. Stratagene www.stratagene.com; Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del sistema de expresión génica proporcionado por esta invención para la producción y obtención de VLPs(-VP4) de la invención.

Las VLPs(-VP4) de la invención pueden ser utilizadas para inmunizar animales, en particular, aves, *per se* o como vectores o vehiculizadores de moléculas con actividad biológica, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización

particular, dichas moléculas con actividad biológica incluyen antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien fármacos que se liberan en su sitio de acción específico, o bien secuencias de ácido nucleico, todas ellas útiles en terapia génica y destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las VLPs(-VP4) de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, aves, frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV). En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de VLPs(-VP4) de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, aves, frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV). En una realización particular, dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger pollos de la infección causada por IBDV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de VLPs(-VP4) de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las VLPs(-VP4) y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará

en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en
5 sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 en células de insecto

10

1.1 Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 con dos rBVs independientes en células de insecto

En este ejemplo se describen los resultados de una serie de experimentos
diseñados para analizar la posibilidad de obtener VLPs de IBDV a partir de una
15 estrategia que evita la síntesis de la poliproteína de IBDV y, por tanto, la presencia de la
proteasa VP4 durante el proceso de ensamblaje. El diseño experimental se basa en la
coexpresión de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV a partir de dos genes quiméricos
independientes. Para ello, se han utilizado dos baculovirus recombinantes (rBVs)
descritos previamente, FB/his-VP3 (Kochan, G., González, D. & Rodríguez, J. F.
20 (2003). Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein
of IBDV. *Archives of Virology* 148, 723-744) y FB/VPX [también identificado como
FB/pVP2 en esta descripción] (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M.,
Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the
assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells.
25 *Virology* 278, 322-331). Estos rBVs fueron generados mediante el clonaje en vectores
apropiados de los DNA complementarios (cDNAs) codificadores de las proteínas pVP2
y pVP3 de IBDV. Dichos cDNAs fueron obtenidos por RT-PCR a partir del segmento
A del genoma de IBDV serotipo I cepa Soroa (número de acceso al NCBI, AAD30136).
El rBV FB/his-VP3 expresa una proteína VP3 quimérica que en su extremo N-terminal
30 contiene un tandem de 6 histidinas fusionadas a la secuencia de VP3 (Met754-Glu1012
de la poliproteína) denominada his-VP3. El rBV FB/pVP2 expresa la región
codificadora de la proteína pVP2 (Met1-Ala512).

El análisis de la expresión de estas proteínas pVP2 y his-pVP3, bien de forma independiente o conjunta, se realizó en cultivos celulares. Para la realización de estos experimentos, se utilizaron cultivos en monocapa de células procedentes del insecto *Trichoplusia ni* (H5, Invitrogen) que fueron crecidos sobre cubreobjetos de cristal.

5 Dichos cultivos fueron infectados independientemente con FB/pVP2, FB/his-VP3, o co-infectados con ambos rBVs. La multiplicidad de infección fue de 5 unidades formadoras de placa (ufp)/célula. A las 48 horas después de la infección (hpi) las células fueron fijadas, e incubadas con sueros policlonales de conejo anti-VP2 y con sueros policlonales de rata anti-VP3 (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P.

10 & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). Después de sucesivos lavados, los cubreobjetos fueron incubados con sueros de cabra anti-rata conjugado con Alexa 594 y con sueros de cabra anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories,

15 Inc.). Los núcleos celulares fueron teñidos con el marcador específico To-Pro-3 (Molecular Probes, Inc.). Finalmente, las muestras se visualizaron por epifluorescencia con un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con el sistema confocal Bio Rad Radiance 2100. Las imágenes obtenidas se almacenaron utilizando el equipo de software Laser Sharp Package (Bio Rad). Como se muestra en la Figura 2a, en los

20 cultivos infectados con FB/pVP2 el suero anti-VP2 mostró una señal granular fina mezclada con estructuras tubulares ambas distribuidas en todo el citoplasma. La señal anti-VP3, detectada en las células infectadas con el rBV FB/his-VP3, se caracterizó por la presencia de acumulaciones de forma esférica alrededor del núcleo y, aparentemente, huecas. En los cultivos coinfectados con ambos rBV se detectó una notable

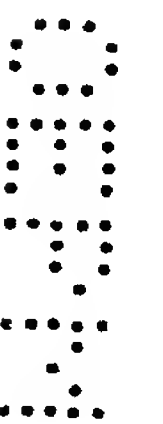
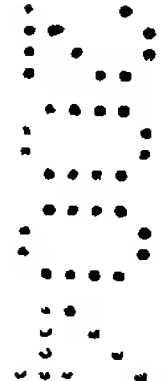
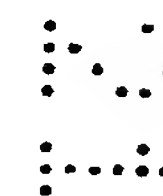
25 modificación en el patrón de distribución de ambas proteínas. En estas células, las señales específicas de pVP2 y VP3 se colocaron en acumulaciones esféricas y densas, sugiriendo que su coexpresión permitía la formación de complejos pVP2/his-VP3 (Figura 2c a la 2e).

Con la intención de caracterizar estas estructuras en mayor detalle, extractos

30 similares, correspondientes a células infectadas con FB/pVP2+FB/hisVP3 fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como control, y en paralelo, se analizaron por la misma técnica cultivos de células H5 infectadas con la cepa silvestre del virus FBD (FastBacDual, Invitrogen). Después de la infección, las

células fueron recogidas a las 48 h, y procesadas como se ha descrito previamente (Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP & Rodríguez JF. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054) para su análisis en cortes ultrafinos por TEM. Como se muestra en la Figura 2, el citoplasma de las células coinfectadas contiene agregados formados por una mezcla de túbulos y estructuras similares a cápsidas (Figura 2g, 2h y 2i). Estos agregados no fueron observados en ningún caso en las muestras correspondientes a células infectadas con el virus silvestre FBD (Figura 2f). El aspecto y el tamaño de los túbulos, así como de las estructuras similares a cápsidas fue semejante a los descritos previamente en cultivos celulares infectados con VT7/Poly, un recombinante del virus vaccinia que expresa el gen de la poliproteína de IB DV (Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP & Rodríguez JF. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054).

Para establecer de forma inequívoca que la coexpresión de pVP2 e his-VP3 permitía el ensamblaje y, por tanto, la obtención de VLPs-(VP4), se decidió purificar las partículas formadas. Para ello, se infectaron con FB/pVP2+FB/his-VP3 cultivos de células H5. 60 hpi, las células se homogeneizaron y los extractos se separaron en gradientes de sacarosa tal y como se ha descrito previamente (Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL & Rodríguez JF. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-6983). Después de su centrifugación, los gradientes fueron fraccionados, y las distintas fracciones fueron analizadas por TEM tal como se ha descrito previamente (Lombardo E *et al.*, citado *supra*). Como control, y sujetos al mismo procedimiento, se fraccionaron gradientes correspondientes a extractos de células infectadas con el rBV FB/VPX o con el rBV FBD/Poly-VP1. El virus recombinante FBD/Poly-VP1 expresa simultáneamente la poliproteína y el polipéptido VP1. Como era predecible, la infección con FBD/Poly-VP1 tenía como resultado una eficiente producción de VLPs (Maraver A, Oña A, Abaitua F, González D, Clemente R, Diaz-Ruiz A, Castón JR, Pazos F & Rodríguez JF. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal



disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49). Por otra parte, las fracciones correspondientes a las células infectadas con FB/VPX solamente contenían túbulos de aspecto retorcido. Los gradientes correspondientes a células coinfectadas con los rBVs FB/pVP2+FB/his-VP3 contenían túbulos rígidos de tipo I en las fracciones cercanas al fondo del gradiente, y VLPs-(VP4) en las centrales y en las fracciones superiores (Figura 3b). Las VLPs-(VP4) aisladas de las células coinfectadas con rBV FB/pVP2+FB/his-VP3 tenían un diámetro de 65-70 nm, así como un contorno poligonal característico, absolutamente indistinguible de las VLPs purificadas de cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49) o de los cultivos infectados con VT7/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054).

Con la intención de conseguir una caracterización bioquímica del material obtenido, se realizaron experimentos de western-blot en los que las distintas fracciones se enfrentaron a sueros específicos contra las proteínas VP1, pVP2, VP3 y VP4 (Fernández-Arias *et al.* 1998, Lombardo *et al.*, 2000). Como control se utilizaron extractos de células infectadas con IBDV. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3d. Como se esperaba, las bandas correspondientes a los polipéptidos VP1 y VP4 sólo fueron detectadas en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los patrones correspondientes a pVP2/VP3 en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1 o coinfectadas con FB/VPX+ FB/his-VP3 fueron similares, detectándose dos bandas correspondientes a pVP2 y VP3, respectivamente.

1.2 Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 con un rBV en células de insecto

Además, se procedió a la construcción del plásmido pFBD/pVP2-his-VP3. El primer paso de la construcción se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 en el vector pFBDual (Invitrogen). El fragmento de DNA correspondiente a pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos identificados

como Oligo I (SEQ ID NO: 1) y Oligo II (SEQ ID NO: 2) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pFBDual (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2. A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA conteniendo la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 mediante digestión del plásmido pFB/his-VP3 (Kochan et al., 2003, citado *supra*) con el enzima RsrII, tratamiento con Klenow, y posterior restricción con KpnI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pFBD/pVP2 previamente digerido con los enzimas SmaI y KpnI. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2-his-VP3 (SEQ ID NO: 3) y contiene la secuencia de nucleótidos codificante de las proteínas pVP2 e his-pVP3 (esta última está codificada por la cadena complementaria a los nucleótidos 6734-7585 de la SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión his-VP3 (pVP2-his-VP3) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 se muestra en la SEQ ID NO: 4.

El plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 permite la obtención de un rBV, denominado FBD/pVP2-his-VP3, que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas simultáneamente [<http://invitrogen.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>].

Los resultados obtenidos con FBD/pVP2-his-VP3 son idénticos a los obtenidos mediante la coinfección con los rBVs FB/pVP2 y FD/his-VP3, obteniéndose VLPs(-VP4) de IBDV.

25

EJEMPLO 2

Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 y VP3 como dos genes independientes en levaduras

Con el fin de estudiar la posibilidad de obtener VLPs(-VP4) de IBDV en cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se generó el vector pESCURA/pVP2-VP3-GFP con el gen heterólogo GFP unido al extremo N-terminal de VP3. El primer paso en la construcción del vector se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 de IBDV en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv se

generó mediante digestión del vector pRS426 (Stratagene) con el enzima PvuII y religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, pESCURAinv, contiene la región de clonaje múltiple en posición invertida con respecto a la del vector parental pRS426. El fragmento de DNA correspondiente a la proteína pVP2 se obtuvo mediante

5 PCR con los oligonucleótidos denominados Oligo III (SEQ ID NO: 5) y Oligo IV (SEQ ID NO: 6) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue

10 purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pESCURA.inv previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2.

El plásmido pFB/VP3-GFP fue construido en dos etapas. La primera consistió en el clonaje de una fragmento de DNA, generado mediante PCR, que contiene la ORF

15 de la proteína VP3 de IBDV carente del codón de terminación. Esta PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos denominados Oligo V (SEQ ID NO: 7) y Oligo VI (SEQ ID NO: 8) y empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of*

20 *General Virology* 79, 1047-1054). El DNA resultante fue digerido con los enzimas EcoRI y BamHI y clonado en el vector pEGFP-N3 (Clontech) también digerido con los mismos enzimas. El plásmido resultante se denominó pVP3-GFP. A continuación, el plásmido pEGFP-GFP fue digerido con los enzimas EcoRI y NotI y clonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó pFB/VP3-GFP.

25 A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA que contenía la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV fusionada a la región codificante de la proteína EGFP mediante digestión del plásmido pFB/VP3-GFP con los enzimas EcoRI y NotI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pESCURA/pVP2 previamente digerido con los enzimas EcoRI y NotI. El plásmido

30 resultante se denominó pESCURA/pVP2-VP3-GFP (SEQ ID NO: 9) y contiene las ORFs de las proteínas pVP2 y VP3-GFP bajo el control transcripcional de dos promotores independientes, GAL 1 y GAL 10, ambos inducibles por galactosa (la proteína pVP2 está codificada por la cadena de nucleótidos complementaria a los

nucleótidos 5862-7343 de la SEQ ID NO: 9). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión VP3-GFP (pVP2-VP3-GFP) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP se muestra en la SEQ ID NO: 10.

5 Posteriormente, pESCURA/pVP2-VP3-GFP se empleó para transformar un cultivo de la levadura *S. cerevisiae* haploide cepa 499 de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002), Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350:87-96). Las levaduras transformadas con el plásmido fueron seleccionadas mediante crecimiento en
10 placas de medio SC (CSM + YNB, glucosa 2% y bacto agar) suplementadas con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carentes de uracilo (-Ura). Tras una incubación de 48 h a 30°C, se seleccionó una colonia que fue empleada para la realización de los subsiguientes análisis de expresión de proteínas y formación de VLPs-(VP4).

15 El análisis de la expresión de las proteínas pVP2 y VP3 y formación de VLPs-(VP4) se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente para la caracterización de VLPs de IBDV en otros sistemas de expresión (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General*

20 *Virology* 79, 1047-1054; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-698). La colonia seleccionada fue cultivada en
25 medio líquido CSM (-Ura) + YNB suplementado con rafinosa al 2%. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo fue empleado para inocular, a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, un matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con el inductor galactosa al 2%. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta una D.O. entre 1,0 y 2,0). Las levaduras fueron centrifugadas a 3.000 rpm, 5 minutos a
30 4°C, se lavaron con agua destilada una vez, y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de proteasas 2X (Compl Roche). Para la lisis se añadió un volumen de "glass beads" (cuentas o perlas de vidrio) de un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma).

Esta mezcla fue sometida al vortex vigoroso durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todo ello a 4°C. Tras ello se recuperó la fracción soluble por centrifugación de la mezcla de lisis a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Esta muestra fue sometida a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa de acuerdo con un

5 protocolo previamente descrito (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Las muestras obtenidas tras el

10 fraccionamiento así como una muestra del material de partida fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology] e inmunodetección por Western blot (Figura 4A) empleando sueros anti-pVP2 y anti-VP3 [Current Protocols in Molecular Biology]. Como se muestra en la Figura 4A, el Western blot reveló la presencia de bandas, con la

15 masa molecular predicha correspondiente a las proteínas pVP2 (48 kDa) y VP3-GFP (61 kDa), así como otras bandas inmunoreactivas de menor tamaño producidas probablemente por degradación proteolítica tanto en la muestra inicial como en las diferentes fracciones del gradiente. Estos resultados demostraron de forma fehaciente la correcta expresión de ambos polipéptidos en el cultivo de *S. cerevisiae* transformado

20 con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3. A continuación, las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas mediante TEM tal como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA

25 VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Como se muestra en la Figura 4B, el análisis mediante TEM de las fracciones del gradiente reveló la existencia de VLPs de IBDV en la fracciones superiores del gradiente. Estas VLPs, VLPs(-VP4), presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros

30 sistemas de expresión (Figura 4C).

...

...

...

...

REIVINDICACIONES

1. Una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), caracterizada porque está constituida, únicamente, por
5 ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV.

2. Un ácido nucleico caracterizado porque su secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que
10 comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

3. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 2.

15 4. Un sistema de expresión seleccionado entre:

a) un sistema de expresión que comprende (i) una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de
20 transcripción y, opcionalmente, de traducción, y (ii) una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y

25 b) un sistema de expresión que comprende una construcción génica según la reivindicación 3, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

5. Sistema de expresión según la reivindicación 4, caracterizado porque se
30 selecciona entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PAC), cósmidos, y virus, que pueden contener, opcionalmente, un origen de replicación heterólogo.

6. Una célula huésped que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 2, o una construcción génica según la reivindicación 3, o un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.

5

7. Una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.

8. Célula huésped según la reivindicación 6 ó 7, caracterizada porque es una
10 célula de insecto o una levadura.

9. Un procedimiento para la producción de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, que comprende cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 6 a
15 8, y, si se desea, recuperar dichas cápsidas vacías de IBDV.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es una célula de insecto, que comprende las etapas de:

20 a) preparar un sistema de expresión seleccionado entre:

- un sistema de expresión constituido por un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica según la reivindicación 3, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y
25

- un sistema de expresión constituido por (i) un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y (ii) un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV;
30

- b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- 5 c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV; y
- d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV.

10 11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es una levadura, que comprende las etapas de:

- 15 a) preparar un sistema de expresión constituido por un plásmido que contiene una construcción génica según la reivindicación 3;
- b) transformar células de levadura con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

- 20 c) cultivar las levaduras transformadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV; y

- 25 d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, las cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV.

30 12. Empleo de un sistema de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, para la producción y obtención de cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV según la reivindicación 1.

13. Empleo de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, en la elaboración de un medicamento.

14. Empleo según la reivindicación 13, en el que dicho medicamento es una vacuna frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.

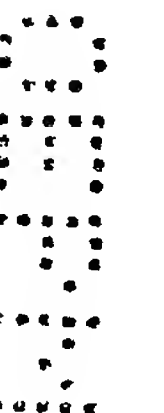
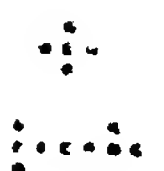
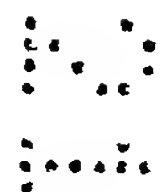
5 15. Empleo según la reivindicación 13, en el que dicho medicamento es un vector para terapia génica.

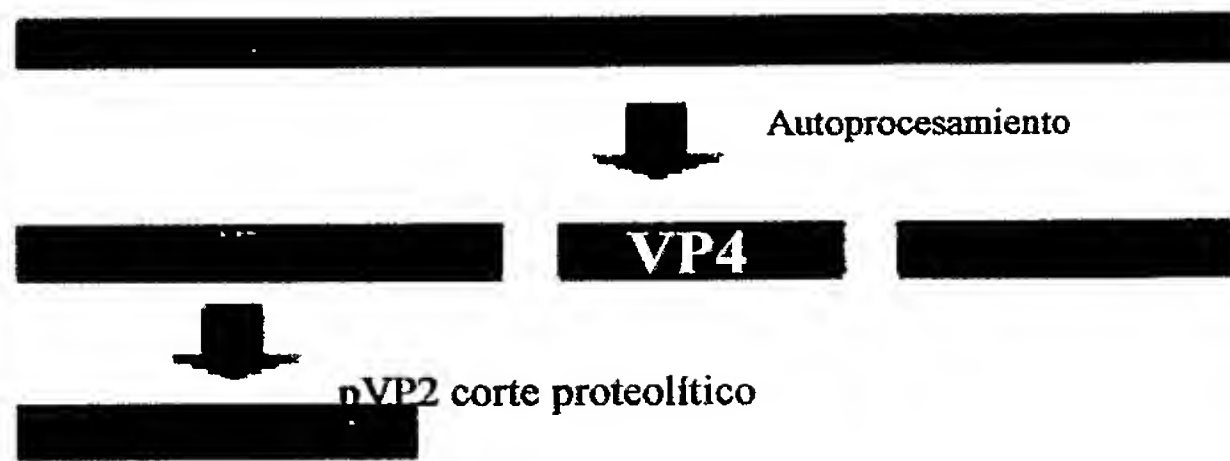
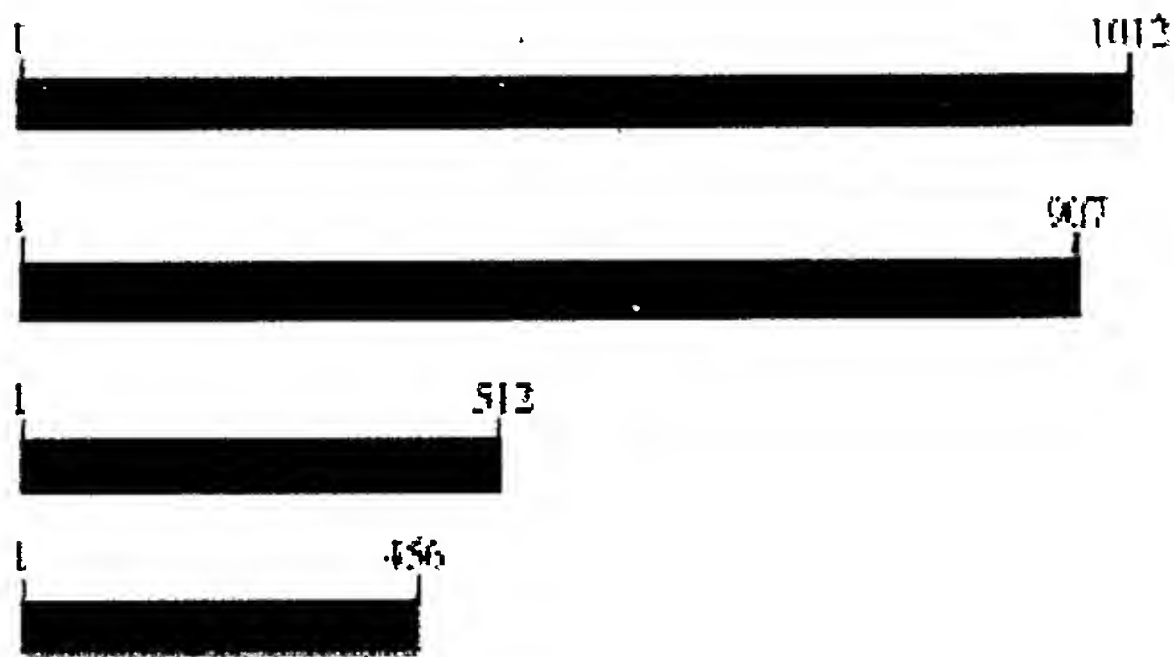
10 16. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV, VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

17. Vacuna según la reivindicación 16, para proteger aves de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

15 18. Vacuna según la reivindicación 17, en la que dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces.

20 19. Una vacuna para proteger pollos de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV) que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV, VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.



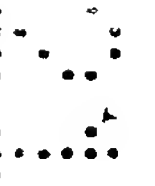
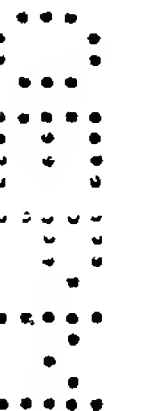
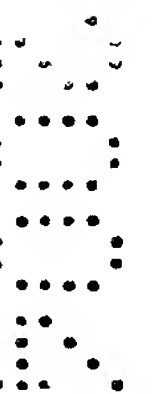
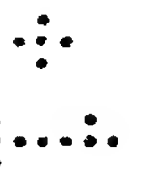
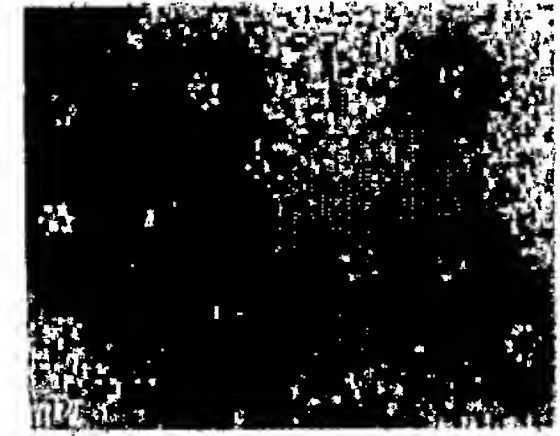
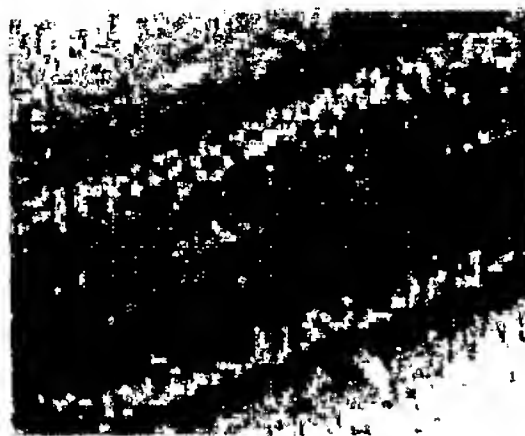
a*b***Construcción Génica****Estructura Resultante**

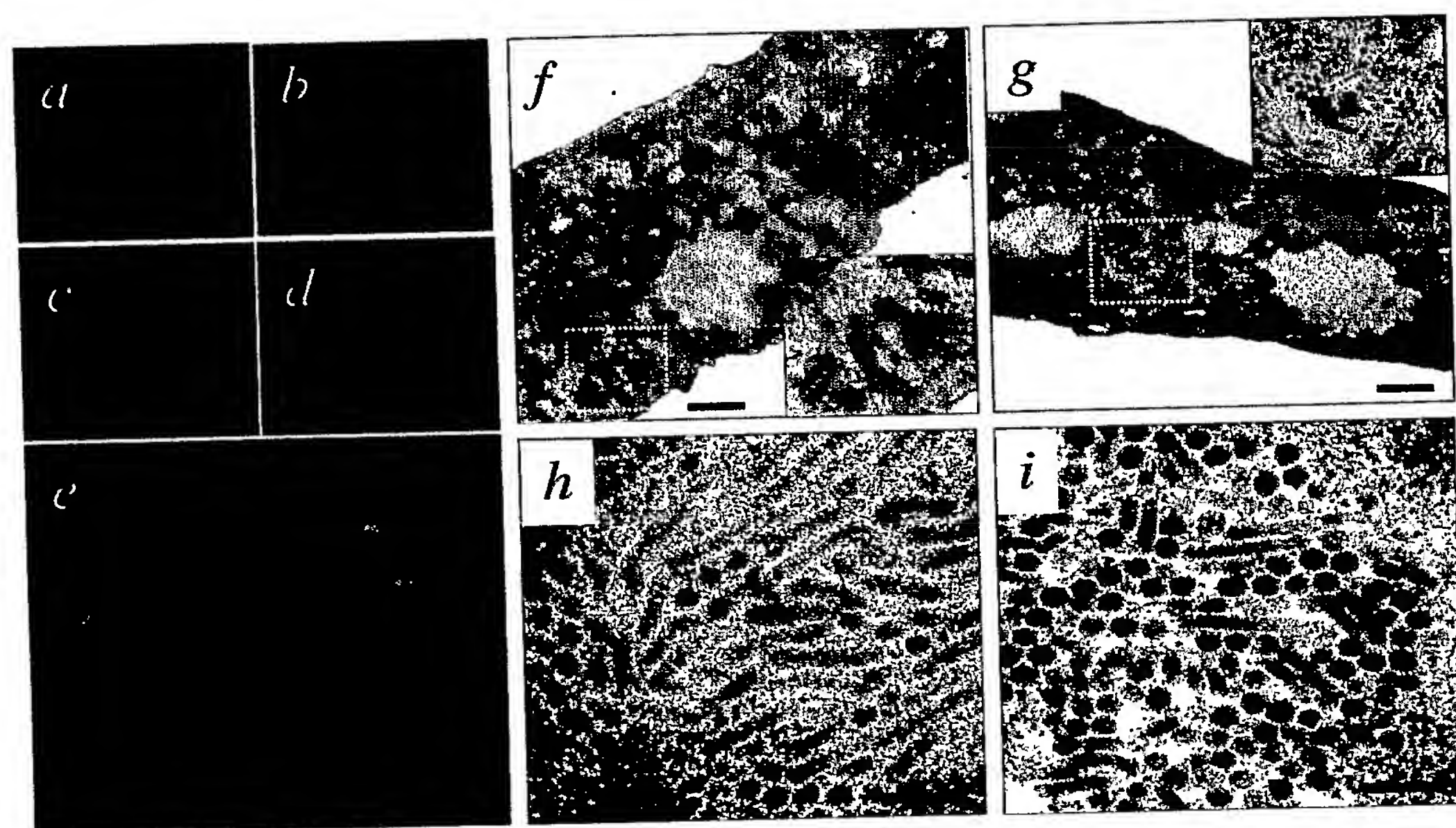
VLP (T=13) y Túbulos de Tipo 1*

Túbulos de Tipo I †

Túbulos retorcidos‡

23 nm T= 1 Cápsidas

**VLP****Túbulos Tipo I****Túbulos Retorcidos****23 nm T=1 Cápsidas****Figura 1**

**Figura 2**

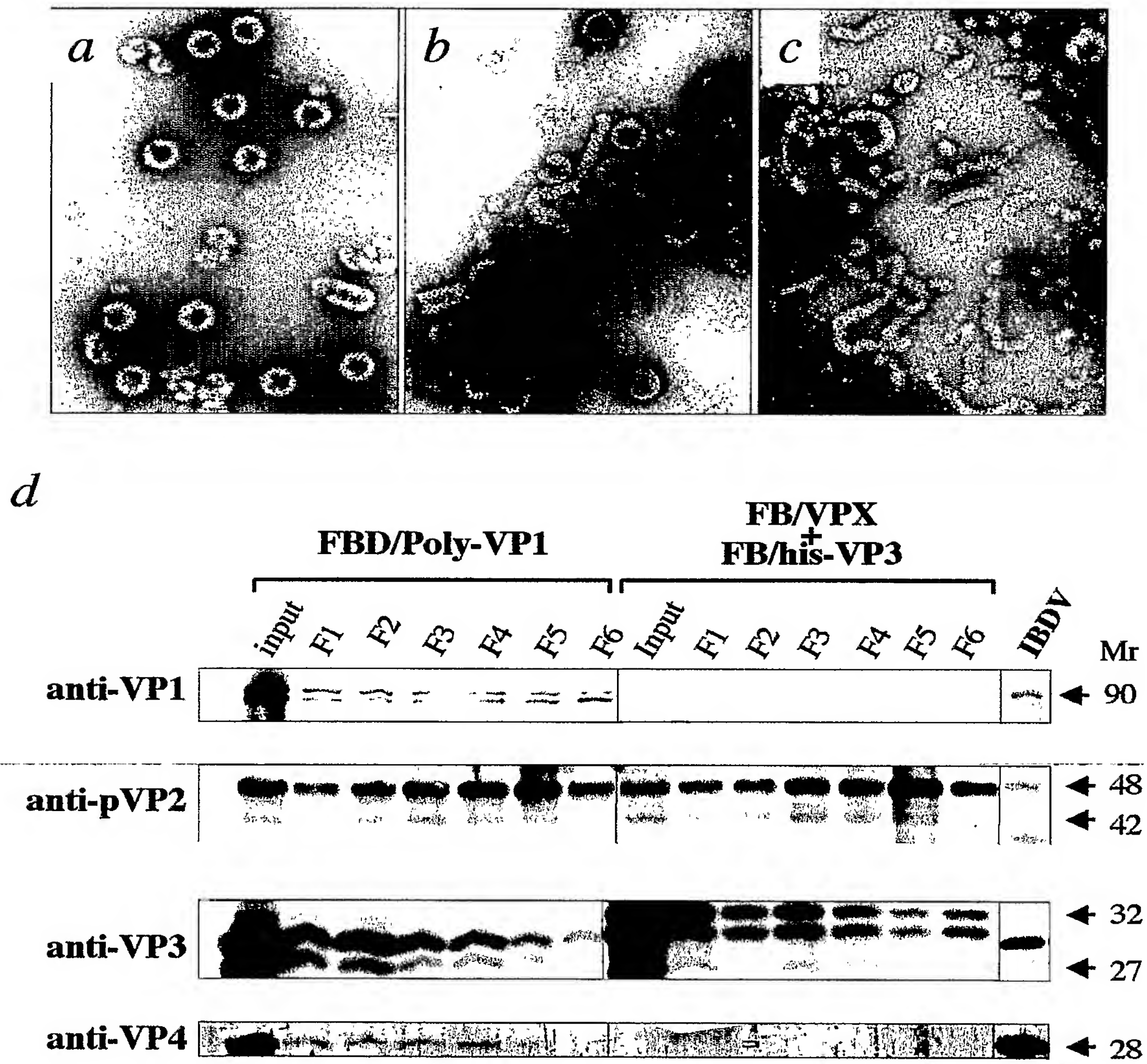


Figura 3

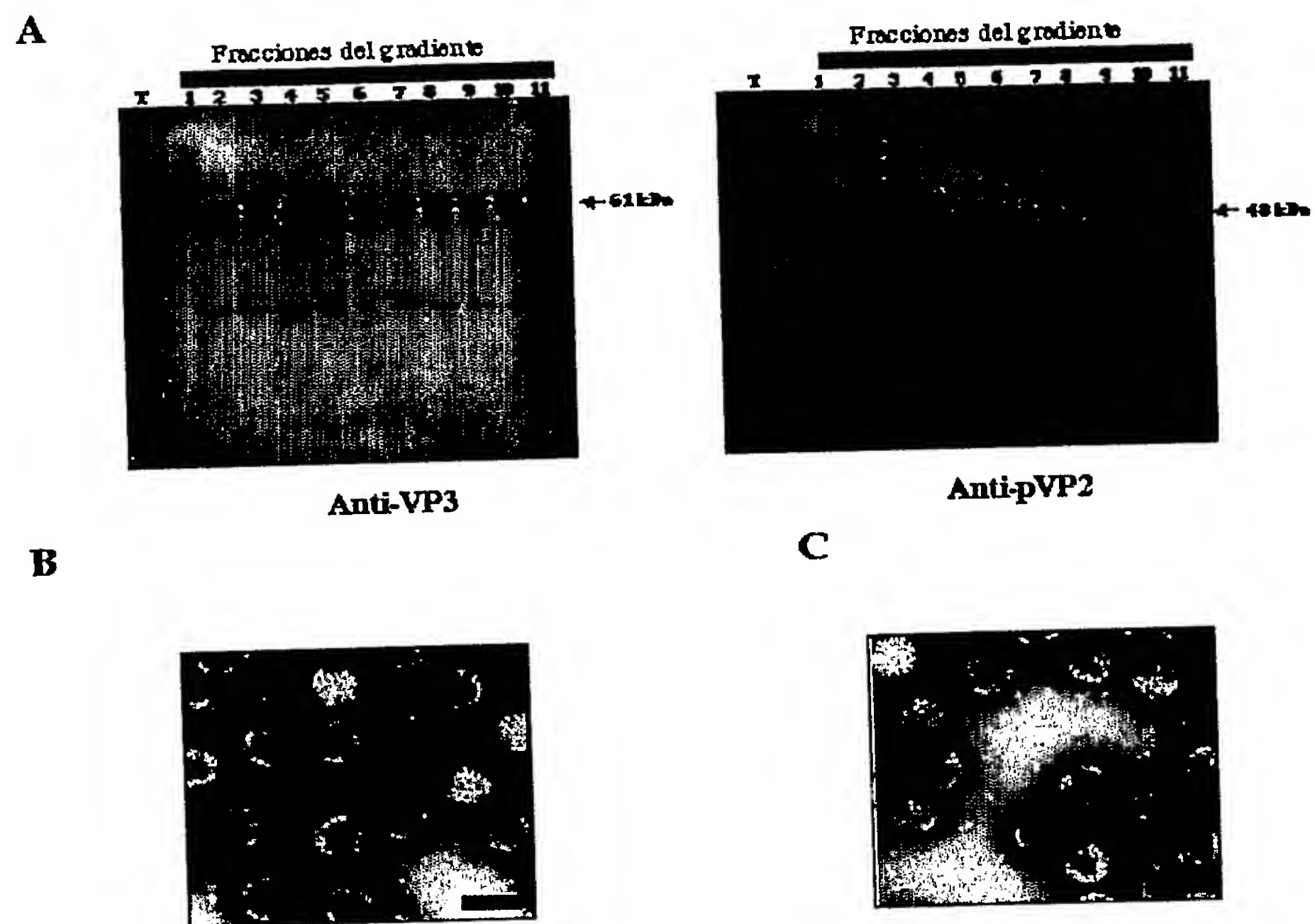


Figura 4

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
- 5 <110> BIONOSTRA, S.L.
- 10 <120> CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES
- <130> VLPs(-VP4)
- 15 <160> 10
<170> PatentIn version 3.1
- 20 <210> 1
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Oligo I

<400> 1
gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc 35
- 30 <210> 2
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
-
- 35 <220>
<223> Oligo II

<400> 2
gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34
- 40
- 45 <210> 3
<211> 7595
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3
- 50 <220>
<221> promotor
<222> (157)..(285)
<223> Promotor ppolh
- 55 <220>
<221> CDS
<222> (291)..(1289)
<223> pVP2 ORF

<220>
 <221> promotor
 <222> (7443)..(7503)
 <223> Promotor p10

5

<400> 3
 ggggtgatcaa gtcttcgctcg agtgattgta aataaaatgt aatttacagt atagtatttt 60

10

aattaatata caaatgatttt gataataatt cttattttaac tataatataat tgtgttgagg 120

tgaattaaag gtccgtatac tccggaatat taatagatca tggagataat taaaatgata 180

accatctcgc aaataaataa gtatttttact gtttttcgtaa cagtttttgta ataaaaaac 240

15

ctataaatat tccggattat tcataccgctc ccaccatcgg gcgcggatct atg aca 296
 Met Thr
 1

20

aac ctg tca gat caa acc cag cag att gtt ccg ttc ata cgg agc ctt 344
 Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Leu
 5 10 15

25

ctg atg cca aca acc gga ccg gcg tcc att ccg gac gac acc ctg gag 392
 Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr Leu Glu
 20 25 30

30

aag cac act ctc agg tca gag acc tcg acc tac aat ttg act gtg ggg 440
 Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr Val Gly
 35 40 45 50

gac aca ggg tca ggg cta att gtc ttt ttc cct gga ttc cct ggc tca 488
 Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ser
 55 60 65

35

att gtg ggt gct cac tac aca ctg cag ggc aat ggg aac tac aag ttc 536
 Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr Lys Phe
 70 75 80

40

gat cag atg ctc ctg act gcc cag aac cta ccg gcc agt tac aac tac 584
 Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr Asn Tyr
 85 90 95

45

tgc agg cta gtg agt cgg agt ctc aca gtg agg tca agc aca ctt cct 632
 Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr Leu Pro
 100 105 110

50

ggg ggc gtt tat gca cta aac ggc acc ata aac gcc gtg acc ttc caa 680
 Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr Phe Gln
 115 120 125 130

gga agc ctg agt gaa ctg aca gat gtt agc tac aat ggg ttg atg tct 728
 Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu Met Ser
 135 140 145

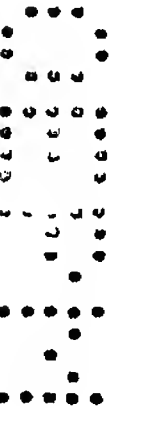
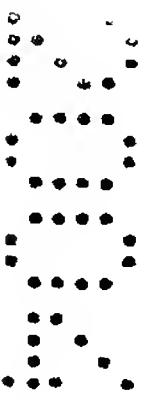
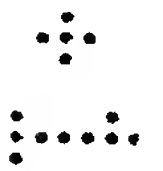
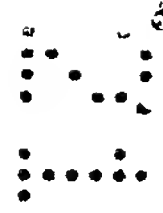
55

gca aca gcc aac atc aac gac aaa att ggg aac gtc cta gta ggg gaa 776
 Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val Gly Glu
 150 155 160

	ggg gtc acc gtc ctc agc tta ccc aca tca tat gat ctt ggg tat gtg	824
	Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly Tyr Val	
	165 170 175	
5	agg ctt ggt gac ccc att ccc gca ata ggg ctt gac cca aaa atg gta	872
	Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys Met Val	
	180 185 190	
10	gcc aca tgt gac agc agt gac agg ccc aga gtc tac acc ata act gca	920
	Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile Thr Ala	
	195 200 205 210	
15	gcc gat gat tac caa ttc tca tca cag tac caa cca ggt ggg gta aca	968
	Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly Val Thr	
	215 220 225	
20	atc aca ctg ttc tca gcc aac att gat gcc atc aca agc ctc agc gtt	1016
	Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser Val	
	230 235 240	
	ggg gga gag ctc gtg ttt cga aca agc gtc cac ggc ctt gta ctg ggc	1064
	Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val Leu Gly	
	245 250 255	
25	gcc acc atc tac ctc ata ggc ttt gat ggg aca acg gta atc acc agg	1112
	Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile Thr Arg	
	260 265 270	
30	gct gtg gcc gca aac aat ggg ctg acg acc ggc acc gac aac ctt atg	1160
	Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn Leu Met	
	275 280 285 290	
35	cca ttc aat ctt gtg att cca aca aac gag ata acc cag cca atc aca	1208
	Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro Ile Thr	
	295 300 305	
40	tcc atc aaa ctg gag ata gtg acc tcc aaa agt ggt ggt cag gca ggg	1256
	Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln Ala Gly	
	310 315 320	
	gat cag atg tca tgg tcg gca aga ggg agc cta gcagtgcga tccatggtgg	1309
	Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu	
	325 330	
45	caactatcca ggggccctcc gtcccgtcac gctagtggcc tacgaaagag tggcaacagg	1369
	atccgtcggt acggtcgctg gggtagcaa ctccgagctg atcccaaata ctgaactagc	1429
50	aaagaacctg gttacagaat acggccgatt tgaccagga gccatgaact acacaaaatt	1489
	gatactgagt gagagggacc gtcttggcat caagaccgtc tggccaacaa gggagtacac	1549
	tgactttcgt gaatacttca tggaggtggc cgacctcaac tctcccctga agattgcagg	1609
55	agcattcggc ttcaaagaca taatccgggc cataaggagg atagctgtgc cgggtggtctc	1669
	cacattgttc ccacctgccg ctcccctagc ccatgcaatt ggggaagggtg tagactacct	1729
60	gctgggcgat gaggcccagg ccgcttcagg aactgctcga gccgcgtcag gaaaagcaag	1789

agctgcctca ggccgcataa ggcagctgac tctcgcctaa gcttgtcgag aagtactaga 1849
 ggatcataat cagccataacc acattttagtag aggttttact tgcttttaaaa aacctcccac 1909
 5 acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttggttaac ttgtttattg 1969
 cagcttataa tgggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 2029
 10 tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 2089
 tctgatcact gcttgagcct aggagatccg aaccagataa gtgaaatcta gttccaaact 2149
 attttgtcat ttttaatttt cgtattagct tacgacgcta caccaggtc ccatctattt 2209
 15 tgtcactctt ccctaaataa tccttaaaaa ctccatttcc acccctccca gttcccaact 2269
 attttgtccg cccacagcgg ggcatttttc ttctgttat gtttttaatc aaacatcctg 2329
 ccaactccat gtgacaaacc gtcactcttcg gctacttttt ctctgtcaca gaatgaaaat 2389
 20 ttttctgtca tctcttcggt attaatgttt gtaattgact gaatatcaac gcttatttgc 2449
 agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt agcggcgcac taagcgcggc ggggtgtggtg 2509
 25 gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cgcccgctcc tttcgctttc 2569
 ttcccttcct ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc 2629
 cctttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt 2689
 30 gatggttcac gtagtgggac atcgccctga tagacgggtt ttcgcccttt gacgttggag 2749
 tccacgttct ttaatagtgg actcttggtc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg 2809
 35 gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag 2869
 ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaaattt aacaaaatat taacgtttac aatttcaggt 2929
 ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacattca 2989
 40 aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg 3049
 aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc 3109
 45 cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg 3169
 ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt 3229
 cgccccgaag aacgtttttc aatgatgagc acttttaag ttctgctatg tggcgcggta 3289
 50 ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat 3349
 gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga 3409
 55 gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca 3469
 acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact 3529
 60 cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc 3589

acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact 3649
 ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt 3709
 5 ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt 3769
 gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt 3829
 10 atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata 3889
 ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatacttttag 3949
 attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat 4009
 15 ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa 4069
 aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca 4129
 20 aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt 4189
 ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg 4249
 tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaata 4309
 25 ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga 4369
 cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc 4429
 30 agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc 4489
 gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca 4549
 ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atcttttatag tctgtcggg 4609
 35 ~~tttegecacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta 4669~~
 tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 4729
 40 cacatgttct ttcctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag 4789
 tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa 4849
 gcggaagagc gcctgatgcy gtattttctc cttacgcata tgtgcggtat ttcacaccgc 4909
 45 agaccagccg cgtaacctgg caaaatcggg tacggttgag taataaatgg atgccctgcy 4969
 taagcgggtg tgggcggaca ataaagtctt aaactgaaca aaatagatct aaactatgac 5029
 50 aataaagtct taaactagac agaatagttg taaactgaaa tcagtccagt tatgctgtga 5089
 aaaagcatac tggacttttg ttatggctaa agcaaactct tcattttctg aagtgcaaata 5149
 tgcccgtcgt attaaagagg ggcgtggcca agggcatggt aaagactata ttcgcggcgt 5209
 55 tgtgacaatt taccgaacaa ctccgcggcc gggaagccga tctcggcttg aacgaattgt 5269
 taggtggcgg tacttgggtc gatatcaaag tgcatacctt cttcccgtat gcccaacttt 5329
 60 gtatagagag ccactgcggg atcgtcaccg taatctgctt gcacgtagat cacataagca 5389



ccaagcgcgt tggcctcatg cttgaggaga ttgatgagcg cgggtggcaat gccctgcctc 5449
 cgggtgctcgc cggagactgc gagatcatag atatagatct cactacgcgg ctgctcaaac 5509
 5 ctggggcagaa cgtaagccgc gagagcgcca acaaccgctt cttgggtcgaa ggcagcaagc 5569
 gcgatgaatg tcttactacg gagcaagttc ccgaggtaat cggagtccgg ctgatgttgg 5629
 gagtaggtgg ctacgtctcc gaactcacga ccgaaaagat caagagcagc ccgcatggat 5689
 10 ttgacttggg cagggccgag cctacatgtg cgaatgatgc ccatacttga gccacctaac 5749
 tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta acatcggtgc tgctgcgtaa catcgttgct 5809
 gctccataac atcaaacatc gaccacggc gtaacgcgct tgctgcttgg atgcccgagg 5869
 catagactgt acaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg cgcggttacc 5929
 accgctgcgt tcgggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgtc acttgcatta 5989
 20 cagtttacga accgaacagg cttatgtcaa ctgggttcgt gccttcaccc gtttccacgg 6049
 tgtgcgtcac ccggcaacct tgggcagcag cgaagtcgag gcatttctgt cctggctggc 6109
 gaacgagcgc aaggtttcgg tctccacgca tcgtcaggca ttggcggcct tgctgttctt 6169
 ctacggcaag gtgctgtgca cggatctgcc ctggcttcag gagatcggta gacctcggcc 6229
 gtcgcggcgc ttgccggtgg tgctgacccc ggatgaagtg gttcgcaccc tcggttttct 6289
 30 ggaaggcgag catcgtttgt tcgcccagga ctctagctat agttctagtg gttggcctac 6349
 gtaccgtag tggctatggc agggcttgcc gcccgcagct tggctgcgag ccctgggcct 6409
 tcacccgaac ttggggggtg ggggtggggaa aaggaagaaa cgcgggcgta ttgggtccaa 6469
 tgggggtctc gtgggggtatc gacagagtgc cagccctggg accgaacccc gcgtttatga 6529
 acaaacgacc caacaccgct gcgttttatt ctgtcttttt attgccgtca tagcgcgggt 6589
 40 tccttcgggt attgtctcct tccgtgttcc agttagcctc ccccatctcc cggtagcgca 6649
 tgctcagaga ctgcaggctc tagattcgaa agcggccgcg actagtgage tcgtcgacgt 6709
 aggcctttga attccggatc ctactcaag gtccctcatca gagacgggtc tgatccagcg 6769
 gccagccga ccaggggggtc tctgtgttgg agcattgggt tttggcttgg gctttggtag 6829
 agccgcctg ggattgcgat gcttcacctc catcgcagtc aagagcagat ctttcacctg 6889
 50 ttcttggttt gggccacgtc catggttgat ttcatagact ttggcaactt cgtctatgaa 6949
 agcttggggg ggctctgcct gtccctggagc cccgtagatc gacgtagctg cccttaggat 7009
 ttgttcttct gatgccaaac ggctcttctc tgcattgcac tagtctagat agtcctcggt 7069
 tgggtccggg atttctcggt tgttctgcca gtactttacc tggcctgggc ttggccctcg 7129
 gtgcccattg agtgctaccc attctgggtg tgcaaagtag atgcccattg tctccatctt 7189
 60

ctttgagatc cgtgtgtctt tttccctctg tgcttctctt ggtgtggggc cccgagcctc 7249
 cactccgtag cctgctgtcc cgtacttggc cctttgcgac ttgctgcctg cttgtgggtgc 7309
 5 gtttgcaaga aaatttcgca tccgatgggc gttcgggtcg ctgagtgcga agttggccat 7369
 gtcagtcaca atcccattct cttccagcca catgaacaca ctgagtgcag attggaatag 7429
 10 tgggtccacg ttggctgctg cttccattgc tctgacggca ctctcgagtt cgggggtctc 7489
 tttgaactct gatgcagcca tggcgccctg aaaatacagg ttttcgggtcg ttgggatatc 7549
 gtaatcgtga tgggtgatggg gatggtagta cgacatgggt tcggac 7595

15

<210> 4
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3

25 <400> 4

Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
 20 25 30

30

Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
 35 40 45

35

Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
 50 55 60

Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
 65 70 75 80

40

Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
 85 90 95

Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
 100 105 110

45

Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
 115 120 125

50

Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
 130 135 140

Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
 145 150 155 160

55

Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
 165 170 175

60

Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
 180 185 190

Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
195 200 205

5 Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
210 215 220

Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
225 230 235 240

10 Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val
245 250 255

Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile
260 265 270

15 Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn
275 280 285

20 Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro
290 295 300

Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln
305 310 315 320

25 Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu
325 330

30 <210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligo III

<400> 5
gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc 35

40 <210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligo IV

50 <400> 6
gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34

55 <210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligo V

••••
••••

••
••••

••••
••••
••••
••••

••••
••••
••••
••••

<400> 7
gcgcgaattc gatggcatca gagttcaaag aga

33

5 <210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligo VI

<400> 8
15 cgcgatccc tcaaggtcct catcagagac gg

32

<210> 9
<211> 9600
<212> DNA
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP

25 <220>
<221> promotor
<222> (5649)..(5859)
<223> Promotor GAL 1 (pVP2)

30 <220>
<221> promotor
<222> (7402)..(8080)
<223> Promotor GAL 2 (VP3-GFP)

35 <220>
<221> CDS
<222> (8086)..(9597)
<223> VP3-GFP ORF

40 <400> 9
ggccgcacta gtatcgatgg attacaagga tgacgacgat aagatctgag ctcttaatta 60
acaattcttc gccagagggtt tgggtcaagtc tccaatcaag gttgtcggct tgtctacctt 120
45 gccagaaatt tacgaaaaga tggaaaaggg tcaaatacgtt ggtagatacg ttggttgacac 180
ttctaaataa gcgaattttct tatgatattat gatattttatt attaaataag ttataaaaaa 240
50 aataagtgtg tacaattttt aaagtgactc ttaggtttta aaacgaaaat tcttattctt 300
gagtaactct ttctgtagg tcagggttgct ttctcaggta tagcatgagg tcgctccaat 360
tcagctgcat. taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc 420
55 ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcgggtatc 480
agctcactca aaggcggtaa tacgggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 540
60 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt 600

tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg 660
 gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg 720
 5 ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag 780
 cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 840
 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 900
 10 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 960
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgctaca gagttcttga agtgggtggcc 1020
 15 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac 1080
 cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtg 1140
 tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 1200
 20 gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttgggt 1260
 catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta 1320
 25 atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 1380
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt 1440
 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg 1500
 30 agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga 1560
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 1620
 35 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg 1680
 catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc 1740
 aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 1800
 40 gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atgggttatgg cagcactgca 1860
 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac 1920
 45 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg 1980
 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 2040
 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc 2100
 50 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 2160
 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaatggt gaatactcat 2220
 55 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 2280
 catatttgaa tgtattttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa 2340
 60 agtgccacct gaacgaagca tctgtgcttc atttttaga acaaaaatgc aacgcgagag 2400

cgctaatttt tcaaacaaag aatctgagct gcattttttac agaacagaaa tgcaacgcga 2460
 aagcgctatt ttaccaacga agaatctgtg cttcattttt gtaaaacaaa aatgcaacgc 2520
 5 gagagcgcta atttttcaaa caaagaatct gagctgcatt tttacagaac agaaatgcaa 2580
 cgcgagagcg ctattttacc aacaaagaat ctatacttct tttttgttct acaaaaatgc 2640
 10 atcccgagag cgctattttt ctaacaaagc atcttagatt actttttttc tcctttgtgc 2700
 gctctataat gcagtctctt gataactttt tgcactgtag gtccgttaag gttagaagaa 2760
 ggctactttg gtgtctattt tctcttccat aaaaaaagcc tgactccact tcccgcgttt 2820
 15 actgattact agcgaagctg cgggtgcatt ttttcaagat aaaggcatcc ccgattatat 2880
 tctataccga tgtggattgc gcatactttg tgaacagaaa gtgatagcgt tgatgattct 2940
 tcattgggtca gaaaattatg aacggtttct tctattttgt ctctatatac tacgtatagg 3000
 20 aatgttttac attttcgtat tgttttcgat tcactctatg aatagttctt actacaattt 3060
 ttttgtctaa agagtaatac tagagataaa cataaaaaat gtagaggctg agtttagatg 3120
 25 caagttcaag gagcgaaagg tggatgggta gggtatatag ggatatagca cagagatata 3180
 tagcaaagag atacttttga gcaatgtttg tggaagcggg attcgcaata ttttagtagc 3240
 tcgttacagt ccggtgcgtt tttggttttt tgaaagtgcg tcttcagagc gcttttggtt 3300
 30 ttcaaaagcg ctctgaagtt cctatacttt ctagagaata ggaacttcgg aataggaact 3360
 tcaaagcgtt tccgaaaacg agcgcttccg aaaatgcaac gcgagctgcg cacatacagc 3420
 35 ~~tcactgttca cgtcgcacct atatctgcgt gttgcctgta tatatatata catgagaaga~~ 3480
 acggcatagt gcgtgtttat gcttaaatgc gtacttatat gcgtctattt atgtaggatg 3540
 aaaggtagtc tagtacctcc tgtgatatta tcccattcca tgcgggggtat cgtatgcttc 3600
 40 cttcagcact acccttttagc tgttctatat gctgccactc ctcaattgga ttagtctcat 3660
 ccttcaatgc tatcattttcc tttgatattg gatcatacta agaaaccatt attatcatga 3720
 45 cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttcgggtgatg 3780
 acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg 3840
 50 atgcogggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tggtggcggg tgtcgggggct 3900
 ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatacc acagcttttc 3960
 aattcaattc atcatttttt ttttattctt ttttttgatt tcggtttctt tgaaattttt 4020
 55 ttgattcggg aatctccgaa cagaaggaag aacgaaggaa ggagcacaga cttagattgg 4080
 tatatatacg catatgtagt gttgaagaaa catgaaattg cccagtattc ttaaccacaac 4140
 60 tgcacagaac aaaaacctgc aggaaacgaa gataaatcat gtcgaaagct acatataagg 4200

aacgtgctgc tactcatcct agtcctgttg ctgccaagct atttaatatc atgcacgaaa 4260
 agcaaacaaa cttgtgtgct tcattggatg ttctgtaccac caaggaatta ctggagtttag 4320
 5 ttgaagcatt aggtcccaaa atttgtttac taaaaacaca tgtggatatc ttgactgatt 4380
 tttccatgga gggcacagtt aagccgctaa aggcattatc cgccaagtac aatttttttac 4440
 10 tcttcgaaga cagaaaattt gctgacattg gtaatacagt caaattgcag tactctgcgg 4500
 gtgtatacag aatagcagaa tgggcagaca ttacgaatgc acacgggtgtg gtgggcccag 4560
 gtattgttag cggtttgaag caggcggcag aagaagtaac aaaggaacct agaggccttt 4620
 15 tgatgttagc agaattgtca tgcaagggtc ccctatctac tggagaatat actaagggtta 4680
 ctgttgacat tgcgaagagc gacaaagatt ttgttatcgg ctttattgct caaagagaca 4740
 tgggtggaag agatgaaggt tacgattggt tgattatgac acccggtgtg ggtttagatg 4800
 20 acaagggaga cgcattgggt caacagtata gaaccgtgga tgatgtggtc tctacaggat 4860
 ctgacattat tattgttgga agaggactat ttgcaaaggg aagggatgct aaggtagagg 4920
 25 gtgaacgtta cagaaaagca ggctgggaag catatttgag aagatgcggc cagcaaaact 4980
 aaaaaactgt attataagta aatgcatgta tactaaactc acaaattaga gcttcaattt 5040
 aattatatca gttattacc cttatgcggtg gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa 5100
 30 taccgcatca ggaaattgta aacgttaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttggt 5160
 aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag 5220
 35 aatagaccga gatagggttg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga 5280
 acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg 5340
 aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggg cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc 5400
 40 ctaaaggag ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg 5460
 aagggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc 5520
 45 gcgtaaccac cacaccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cgccattcgc 5580
 cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgc ggcctcttcg ctattacgcc 5640
 agctggatct tcgagcgtcc caaaaccttc tcaagcaagg ttttcagtat aatgttacat 5700
 50 gcgtacacgc gtctgtacag aaaaaaaga aaaatttgaa atataaataa cgttcttaat 5760
 actaacataa ctataaaaaa ataaataggg acctagactt caggttgtct aactccttcc 5820
 55 ttttcggtta gagcggatct tagctagccg cggtaccaag cttaggcgag agtcagctgc 5880
 cttatgcggc ctgaggcagc tcttgctttt cctgacgcgg ctcgagcagt tcctgaagcg 5940
 60 gcctgggct catcgcccag caggtagtct acaccttccc caattgcatg ggctagggga 6000

gcggcaggtg ggaacaatgt ggagaccacc ggcacagcta tcctccttat ggcccggatt 6060
 atgtctttga agccgaatgc tcctgcaatc ttcaggggag agttgaggtc ggccacctcc 6120
 5 atgaagtatt cacgaaagtc agtgtactcc cttgttggcc agacggtctt gatgccaaga 6180
 cggtcctctc cactcagtat caatthttgtg tagttcatgg ctccctgggtc aaatcggccg 6240
 10 tattctgtaa ccagggtctt tgctagttca ggatttggga tcagctcgaa gttgctcacc 6300
 ccagcgaccg taacgacgga tcctgttgcc actctttcgt aggccactag cgtgacggga 6360
 cggagggccc ctggatagtt gccaccatgg atcgtcactg ctaggctccc tcttgccgac 6420
 15 catgacatct gatccctgc ctgaccacca cttttggagg tcactatctc cagtttgatg 6480
 gatgtgattg gctgggttat ctgthttgtt ggaatcacia gattgaatgg cataaggttg 6540
 20 tcggtgccgg tcgtcagccc attgthttgcg gccacagccc tgggtgattac cgttgthcca 6600
 tcaaagccta tgaggtagat ggtggcgccc agtacaaggc cgtggacgct tgttcgaaac 6660
 acgagctctc ccccaacgct gaggcttgth atggcatcaa tgttggtga gaacagthg 6720
 25 attgthtacc cacctggttg gtactgtgat gagaattggt aatcatcggc tgcagthtatg 6780
 gtgtagactc tgggcctgth actgctgtca catgtggcta ccattthttgg thcaagccct 6840
 30 attgcgggaa tggggthcacc aagcctcaca tacccaagat catatgatgt gggtaagctg 6900
 aggacggtga ccccttcccc tactaggacg thcccaattt thtctgtgat gthggctgth 6960
 gcagacatca acccattgta gctaacatct gthagthcac thaggcttcc thggaaggth 7020
 35 ~~acggcgthta tggthccgth tagthcataa acccaccag-gaagthgct thacctcact 7080~~
 gtgagactcc gactcactag cctgcagtag thgtaactgg ccggtaggth ctgggcagth 7140
 40 aggagcatct gatcgaactt gtagthccca thgcctgca gthgtgtagth agcaccaca 7200
 attgagccag ggaatccagg gaaaaagaca attagccctg accctgthgth cccacagth 7260
 aaattgtagg thgaggtctc thacctgaga gthgtgcttct ccagggtgth gthccggaatg 7320
 45 gacgccggtc cgttgthtg catcagaagg ctccgtatga accgaacaat ctgctgggtth 7380
 thgatctgaca ggtthgtcat agatccgggg thththctcc thgacgthta agtatagagg 7440
 50 tatattaaca atthththgth gatactthta thacattthga ataagaagta atacaaaccg 7500
 aaaatgthga aagtattagt taaagtggth atgcagthth thcattthata thctgthta 7560
 tagatcaaaa atcatcgctt cgctgattaa thaccccaaga aataaggcta aaaaactaat 7620
 55 cgcattatca tcctatggth gthtaattthga thcgttcatt thgaaggthth tggggccagg 7680
 thactgcaa thththctct thcataaccat aaaagctagt attgtagaat cththattgth 7740
 60 cggagcagth cggcgcgagg cacatctgcg ththcaggaac gcgaccggtg aagacgagga 7800

	cgcacggagg agagtcttcc ttoggagggc tgtcaccgcg tggcgggctt ctaatccgta	7860
	cttcaatata gcaatgagca gttaagcgta ttactgaaag ttccaaagag aagggtttttt	7920
5	taggctaaga taatgggggt ctttacattt ccacaacata taagtaagat tagatatgga	7980
	tatgtatatg gatattgata tgggtggtaat gccatgtaat atgattatta aacttctttg	8040
10	cgtccatcca aaaaaaaagt aagaattttt gaaaattcga attcg atg gct gca tca	8097
	Met Ala Ala Ser	
	1	
15	gag ttc aaa gag acc ccc gaa ctc gag agt gcc gtc aga gca atg gaa	8145
	Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala Met Glu	
	5 10 15 20	
20	gca gca gcc aac gtg gac cca cta ttc caa tct gca ctc agt gtg ttc	8193
	Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu Ser Val Phe	
	25 30 35	
	atg tgg ctg gaa gag aat ggg att gtg act gac atg gcc aac ttc gca	8241
	Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met Ala Asn Phe Ala	
	40 45 50	
25	ctc agc gac ccg aac gcc cat cgg atg cga aat ttt ctt gca aac gca	8289
	Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe Leu Ala Asn Ala	
	55 60 65	
30	cca caa gca ggc agc aag tcg caa agg gcc aag tac ggg aca gca ggc	8337
	Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr Gly Thr Ala Gly	
	70 75 80	
35	tac gga gtg gag gct cgg ggc ccc aca cca gag gaa gca cag agg gaa	8385
	Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu Ala Gln Arg Glu	
	85 90 95 100	
40	aaa gac aca cgg atc tca aag aag atg gag acc atg ggc atc tac ttt	8433
	Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met Gly Ile Tyr Phe	
	105 110 115	
	gca aca cca gaa tgg gta gca ctc aat ggg cac cga ggg cca agc cca	8481
	Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg Gly Pro Ser Pro	
	120 125 130	
45	ggc cag gta aag tac tgg cag aac aaa cga gaa ata ccg gac cca aac	8529
	Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Asn	
	135 140 145	
50	gag gac tat cta gac tac gtg cat gca gag aag agc cgg ttg gca tca	8577
	Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser Arg Leu Ala Ser	
	150 155 160	
55	gaa gaa caa atc cta agg gca gct acg tcg atc tac ggg gct cca gga	8625
	Glu Glu Gln Ile Leu Arg Ala Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ala Pro Gly	
	165 170 175 180	
60	cag gca gag cca ccc caa gct ttc ata gac gaa gtt gcc aaa gtc tat	8673
	Gln Ala Glu Pro Pro Gln Ala Phe Ile Asp Glu Val Ala Lys Val Tyr	
	185 190 195	

A 10x10 grid of dots forming the letters 'E' and 'U'. The 'E' is formed by dots at (row, col) coordinates: (1,1)-(1,9), (2,1)-(2,9), (3,1)-(3,9), (4,1)-(4,9), (5,1)-(5,9), (6,1)-(6,9), (7,1)-(7,9), (8,1)-(8,9), (9,1)-(9,9), (10,1)-(10,9). The 'U' is formed by dots at: (1,1)-(1,9), (2,1)-(2,9), (3,1)-(3,9), (4,1)-(4,9), (5,1)-(5,9), (6,1)-(6,9), (7,1)-(7,9), (8,1)-(8,9), (9,1)-(9,9), (10,1)-(10,9).

gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc 9441
 Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
 440 445 450

5 atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc 9489
 Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr
 455 460 465

10 cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc 9537
 Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
 470 475 480

15 ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag 9585
 Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu
 485 490 495 500

ctg tac aag taa agc 9600
 Leu Tyr Lys

20

<210> 10
 <211> 503
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP

30 <400> 10
 Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val
 1 5 10 15

35 Arg Ala Met Glu Ala Ala Ala Asn Val Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala
 20 25 30

Leu Ser Val Phe Met Trp Leu Glu Glu Asn Gly Ile Val Thr Asp Met
 35 40 45

40 Ala Asn Phe Ala Leu Ser Asp Pro Asn Ala His Arg Met Arg Asn Phe
 50 55 60

45 Leu Ala Asn Ala Pro Gln Ala Gly Ser Lys Ser Gln Arg Ala Lys Tyr
 65 70 75 80

Gly Thr Ala Gly Tyr Gly Val Glu Ala Arg Gly Pro Thr Pro Glu Glu
 85 90 95

50 Ala Gln Arg Glu Lys Asp Thr Arg Ile Ser Lys Lys Met Glu Thr Met
 100 105 110

Gly Ile Tyr Phe Ala Thr Pro Glu Trp Val Ala Leu Asn Gly His Arg
 115 120 125

55 Gly Pro Ser Pro Gly Gln Val Lys Tyr Trp Gln Asn Lys Arg Glu Ile
 130 135 140

60 Pro Asp Pro Asn Glu Asp Tyr Leu Asp Tyr Val His Ala Glu Lys Ser
 145 150 155 160

	Arg	Leu	Ala	Ser	Glu	Glu	Gln	Ile	Leu	Arg	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Tyr	
					165					170					175		
5	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Glu	Pro	Pro	Gln	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Val	
				180				185						190			
	Ala	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Asn	His	Gly	Arg	Gly	Pro	Asn	Gln	Glu	Gln	
			195				200						205				
10	Met	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Met	Glu	Met	Lys	His	Arg	Asn	Pro	
		210					215					220					
	Arg	Arg	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Asn	Ala	Pro	Thr	Gln	
15						230					235					240	
	Arg	Pro	Pro	Gly	Arg	Leu	Gly	Arg	Trp	Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Asp	Glu	
					245					250					255		
20	Asp	Leu	Glu	Gly	Ser	Ile	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	
				260					265					270			
	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	
			275					280					285				
25	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	
		290					295					300					
	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	
30		305				310					315					320	
	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	
					325					330					335		
35	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	
				340					345					350			
	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	
			355					360					365				
40	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	
		370					375					380					
	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	
45		385				390					395					400	
	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	
					405				410						415		
50	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	
			420						425					430			
	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	
			435				440						445				
55	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	
		450				455						460					
	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	
60		465				470					475					480	

Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
485 490 495

5 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
500

